Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 729-745

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص. ۷۴۵ -۷۲۹

مقاله پژوهشی

تاثیر پوشش خوراکی بر پایه کیتوزان و پروتئین آب پنیر حاوی نانوکامپوزیت‌های زیستی و اسانس آویشن شیرازی بر ماندگاری پنیر فتای فراپالایش

مریم گوهرگانی[۱]- حنان لشکری[۲]*- علیرضا شیرازی‌نژاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۳۰

چکیده

در طی سال‌های اخیر تمایل به استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی ضدمیکروبی افزایش یافته است، که این امر باعث افزایش کیفیت، ایمنی و زمان ماندگاری مواد غذایی گردیده است. در این پژوهش از پوشش ایزوله پروتئین آب پنیر و کیتوزان به نسبت۷۰:۳۰، حاوی نانوکامپوزیت‌های زیستی دی اکسید تیتانیوم (TiO_2، ۱ و ۲٪) و اسانس آویشن شیرازی (۱٪) جهت افزایش ماندگاری پنیر فتای فراپالایش استفاده شد. نمونه‌های پنیر تحت آزمون‌های مختلف میکروبی، فیزیکو شیمیایی و حسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات TiO_2 و اسانس آویشن شیرازی موجب کاهش قابل توجه شمارش کلی باکتری‌ها، اسید لاکتیک باکتری‌ها و کلی‌فرم‌ها با افزایش دوره نگهداری شدند. همچنین تعداد کپک و مخمر در نمونه شاهد نسبت به سایر تیمارها با گذشت زمان افزایش یافت. در حالی‌که تیمارهای حاوی اسانس در طی ذخیره‌سازی فاقد کپک و مخمر بودند. ارزیابی فیزیکوشیمیایی نشان داد که درصد رطوبت، چربی، pH، در تمامی پنیرهای پوشش داده شده کاهش، اسیدیته و سفتی بافت افزایش یافت. ارزیابی حسی پنیرهای فتای فراپالایش نشان داد که عطر، طعم و مقبولیت کلی پنیرهای پوشش داده شده در مقایسه با پنیر داخل آب نمک بهبود پیدا کرده است، در حالی‌که در پنیرهای پوشش داده شده حاوی اسانس به‌دلیل اثر منفی اسانس آویشن شیرازی بر خواص ارگانولپتیکی پنیر، مقبولیت کلی به‌طور قابل توجهی کمتر شد. جهت ارزیابی اثرات مهارکنندگی تیمارهای مختلف پوشش کامپوزیتی بر جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز*های تلقیحی در پنیر فراپالایش، از آن‌ها فیلم تهیه شد و قدرت بازدارندگی فیلم‌های کامپوزیتی بررسی گردید. نتایج نشان داد که فیلم‌های کامپوزیتی به‌ویژه فیلم‌های حاوی اسانس به‌طور محسوسی جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* را با افزایش دوره نگهداری کاهش دادند. در نتیجه، فیلم‌های کامپوزیتی حاوی نانوذرات و اسانس آویشن می‌توانند در سیستم‌های بسته‌بندی مواد غذایی به‌ویژه برای پنیر فتای فراپالایش به‌کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، ایزوله پروتئین آب پنیر، پنیر فتا فراپالایش، پوشش‌دهی، کیتوزان، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم.

مقدمه

پنیر یکی از فرآورده‌های مهم شیر است که ارزش غذایی خاصی در تغذیه انسان داشته و به سبب شکل، بافت، عطر و طعم متفاوت، جزء متنوع‌ترین فرآورده لبنی محسوب می‌شود (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۷). در حال حاضر تنوع پنیرهای موجود، بالغ بر ۲۰۰۰ نوع برآورد شده که این تعداد نیز رو به افزایش است (لشکری و همکاران، ۱۳۹۷). یکی از روش‌های نوین تولید پنیر، استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون است (Divsalar *et al*., 2018). این محصول به علت دارا بودن pH پایین توسط میکروارگانیسم‌های نامطلوب به‌ویژه کپک و مخمر آلوده می‌شود. در پنیر سفید فراپالایش، عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده شامل کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های اسپوردار و مخمرهای تخمیرکننده لاکتوز هستند. *لیستریا مونوسیتوژنز* عامل بیماری *لیستریوزیس* با مصرف پنیر منتقل می‌شود. لذا رعایت اصول بهداشتی در تولید و بسته‌بندی حائز اهمیت است (Martins *et al*., 2010). تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد غذایی سالم منجر به ظهور تکنیک‌ها و به‌کارگیری مواد جدید در بسته‌بندی شده است. یکی از این تکنیک‌ها، استفاده از بسته بندی های فعال می‌باشد که در این راستا می‌توان به بسته‌بندی فعال حاوی نانوذرات و اسانس‌ها اشاره نمود (Conte *et al*., 2009). پوشش‌ها یا فیلم‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی باشند که در طی زمان از بسته‌بندی آزاد شوند و نقش موثر خود را ایفا کنند (Del Nobile *et al*., 2009).

۱ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران.
۲-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد زرین دشت، دانشگاه آزاد اسلامی، زرین دشت، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: hlashkari@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i5.88681

پژوهش‌های بسیاری در زمینه استفاده از پوشش‌های خوراکی در پنیر انجام شده است. رمضانی و همکاران (۱۳۹۵) تاثیر پوشش خوراکی بر پایه آب پنیر و ناتامایسین را بر کیفیت و ماندگاری پنیر سفید ایرانی بررسی کردند و نشان دادند پوشش حاوی ناتامایسین می‌تواند تا ۶۰ روز از رشد کپک *پنی‌سیلیوم کرایزوجنوم* تلقیح شده به سطح پنیر جلوگیری نماید. Conte و همکاران (۲۰۰۷) بسته‌بندی فعال حاوی عصاره لیمو را برای افزایش عمر ماندگاری پنیر موزارلا و بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده و پوشش آلژینات سدیم را در پنیر Fior di latte (۲۰۰۹) بررسی کردند و شاهد افزایش عمر نگهداری پنیر بودند. Di Pierro و همکاران (۲۰۱۱) فیلم کیتوزان- پروتئین آب‌پنیر را تحت شرایط اتمسفر اصلاح شده در پنیر ارزیابی کردند و مشاهده کردند جمعیت باکتریایی در نمونه‌های پنیر پوشش داده شده کمتر از نمونه کنترل است. Zhong و همکاران (۲۰۱۴) اثر سه پوشش مختلف (کیتوزان، آلژینات سدیم و ایزوله پروتئین سویا) برای پنیر موزارلا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که پنیر پوشش‌دار شده با آلژینات‌سدیم بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را در طول ذخیره‌سازی داشت. Youssefو همکاران (۲۰۱۵، ۲۰۱۶) در مطالعه خود نانوکامپوزیت‌های بر پایه کیتوزان را در پنیر استفاده کردند و مشاهده کردند نانوکامپوزیت‌ها فعالیت ضدمیکروبی خوبی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها نشان می‌دهند. Meira و همکاران (۲۰۱۶) فیلم‌های نانوکامپوزیتی نشاسته/ هالویزیت/ نیسین را به‌عنوان یک بسته‌بندی ضدمیکروبی فعال تولید نموده و تاثیر این نانوکامپوزیت را بر مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر نرم ارزیابی کردند. Artiga-Artigas و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه خود از پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس پونه در پنیر استفاده کردند. Divsalar و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند فیلم کامپوزیتی کیتوزان- سلولز حاوی نیسین دارای فعالیت ضدباکتریایی است و می‌توان از آن برای بسته‌بندی پنیر استفاده کرد. Lotfi و همکاران (۲۰۱۸) از ترکیب مونولائورین در فیلم کیتوزان/ سلولز برای کنترل رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در بسته‌بندی پنیر استفاده کردند.

در این پژوهش اثر پوشش خوراکی کامپوزیتی بر پایه کیتوزان و پروتئین آب‌پنیر حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) و اسانس آویشن شیرازی بر زمان ماندگاری، ویژگی‌های شیمیایی، میکروبی، بافتی و حسی پنیر فتای فراپالایش بررسی گردید. علاوه بر این، تاثیر مهارکنندگی فیلم‌ها بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کیتوزان از Bio Basic (کانادا)، ایزوله پروتئین آب پنیر(WPI) از Hilmar (آمریکا) و تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) از شرکت Acros (آمریکا) خریداری شد. اسانس آویشن شیرازی از شرکت باریج اسانس (کاشان) و پنیر فتای فراپالایش از شرکت چوپان (تهران) تهیه گردید. هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اسید استیک، نترینت آگار و براث و گلیسرول از Sigma (آمریکا) خریداری شد. محیطهای کشت MRS، M17، پلیت کانت آگار (PCA)، ویولیت‌رد بایل آگار (VRBA)، پوتیتو دکستروز آگار (PCA)، لیستریا سلکتیو آگار (LSA) و بافر پپتون از شرکت Quelab (کانادا) تهیه گردید.

تهیه فیلم

بدین منظور ابتدا محلول ۳ درصد ایزوله پروتئین آب‌پنیر تهیه و به مدت یک شبانه روز آبدار گردید. pH محلول با سود ۲ مولار در ۸ تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سیلسیوس جهت دناتوراسیون با همزنی آرام حرارت داده و سپس به سرعت سرد شد. محلول ۱٪ درصد کیتوزان نیز با حل کردن کیتوزان در محلول ۲٪ اسید استیک با هم زنی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت، تهیه گردید. سپس، محلول‌های مادر ایزوله پروتئین آب‌پنیر و کیتوزان آماده شده با نسبت ۷۰:۳۰ (پروتئین به کیتوزان) مخلوط گردیدند. پس از ۱۵ دقیقه هم زده شدن، گلیسرول به مقدار ۳۰ درصد وزنی ماده خشک محلول تشکیل دهنده فیلم اضافه گردیده و TiO_2 به مقدار ۱ و ۲ درصد وزنی ماده خشک افزوده شد. پس از حل شدن کامل (یک ساعت) با همزنی در ۶۰۰ دور بر دقیقه، اسانس آویشن شیرازی به مقدار صفر و ۱ درصد حجمی به محلول‌های تشکیل دهنده اضافه شد. همه محلول‌ها تحت تیمار فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه با توان ۱۰۰ وات قرار گرفتند و پس از گازدایی به‌منظور پوشش‌دهی و تهیه فیلم استفاده شدند. برای تهیه فیلم محلول‌ها در آون فیلم خشک‌کن، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه خشک شدند. مشروط‌سازی فیلم‌ها در نمک اشباع نیترات منیزیم به مدت ۴۸ ساعت قبل از هرگونه آنالیز انجام گرفت (Pluta-Kubica *et al*., 2019). فیلم‌های کامپوزیتی شامل ۵ تیمار زیر بودند:

- کنترل (مخلوط ایزوله پروتئین با کیتوزان)
- کنترل + ۱ درصد TiO_2
- کنترل + ۲ درصد TiO_2
- کنترل + ۱ درصد TiO_2 + ۱ درصد اسانس آویشن شیرازی
- کنترل + ۲ درصد TiO_2 + ۱ درصد اسانس آویشن شیرازی

تولید پنیر فتای فراپالایش و پوشش‌دهی آن

نمونه‌های پنیر در کارخانه پنیرسازی چوپان تولید شدند. پس از انجام باکتوفوگاسیون، پاستوریزاسیون (۷۶ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه)، اولترافیلتراسیون شیر، هموژنیزاسیون (فشار ۷۰ بار) ناتراوه انجام شد. با افزودن استارتر (۱۰ واحد به ازای ۱۰۰۰ لیتر شیر)، pH شیر به سطح ۶/۲ رسانده شد. سپس، رنت (۰/۰۰۴ گرم به ازای ۱۰۰ گرم

مخلوط) و نمک (۲ گرم به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم ناتراوه) با آب مخلوط شده و به ظرف پنیرسازی اضافه گردید. ناتراوه به تونل انعقاد با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انتقال داده شد تا لخته تشکیل گردد، سپس به گرمخانه منتقل گردیدند. جهت پوشش‌دهی، لخته‌ها از گرمخانه خارج و سپس محلول‌های پوششی مورد نظر (همان محلول‌های تولیدی در تهیه فیلم) با استفاده از یک دستگاه اسپری مجهز به تفنگ پاششی بر روی آن‌ها اسپری و بسته‌بندی با فویل آلومینیومی انجام گرفت. در نهایت پنیرها به سردخانه با دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شدند. آزمون‌های میکروبی، فیزیکوشیمیایی و حسی در دوره‌های مختلف رسیدن (۳ تا ۶۰ روز) با سه تکرار انجام شدند (Nottagh *et al*., 2019).

آزمون‌های میکروبی

ارزیابی میکروبی جهت بررسی رشد میکروب های آلوده کننده و استارترها صورت گرفت. در همه موارد در نهایت نتایج بر حسب log cfu/g گزارش گردید. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت. شمارش کلی باکتری‌ها توسط محیط کشت PCA، بر اساس استاندارد شماره ۸۲۴۸ شمارش شدند. شمارش باکتری‌های *لاکتوکوکسی* در محیط M17 آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط هوازی مورد استفاده قرار گرفت (Yangilar, 2017). شمارش باکتری‌های *لاکتوباسیل* در محیط MRS آگار تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت به‌کار گرفته شد (Soleiman-Rambod *et al*., 2018). برای شمارش کلی کلی‌فرم‌ها از محیط کشت VRB آگار به‌صورت کشت پورپلیت با گرمخانه‌گذاری هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (Yangilar, 2017). برای شمارش جمعیت کپک و مخمر از روش کشت سطحی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت استفاده شد. محیط کشت PDA اسیدی شده به pH ۳/۵ با محلول ۱۰درصد استریل اسید لاکتیک برای کشت سطحی مورد استفاده قرار گرفت (Soleiman-Rambod *et al*., 2018).

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

چربی به روش ژربر (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۷۶۰۲)، اسیدیته قابل تیتراسیون بر مبنای اسید لاکتیک (وزنی/ وزنی)، pH با استفاده از یک pHمتر الکترونیک (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۸۵۲)، و درصد رطوبت نیز با استفاده از اون اندازه‌گیری گردیدند (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۷). برای تعیین ویژگی‌های بافتی نمونه‌ها از دستگاه بافت‌سنج (تستومتریک، انگلیس) استفاده شد. برای این کار قطعه مکعبی از پنیر به ابعاد ۲/۵۴ سانتی‌متر به وسیله پروب پیستونی به قطر ۴۹ میلی متر با سرعت ۳۰ میلی‌متر بر دقیقه تا ۴۰ درصد از ارتفاع اولیه فشرده گردید. نیروی وارده توسط سل دستگاه ۵۰۰ نیوتن بود. تنش گسیختگی نمونه‌ها از تقسیم نیروی فشاری ثبت شده در نقطه شکستن نمونه بر سطح مقطع نمونه محاسبه و بر حسب نیوتن بیان گردید (Berti *et al*., 2019).

آزمون حسی

تیمارها به‌صورت تصادفی کدگذاری و به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا به تعادل دمایی برسند. سپس ارزیابی رنگ، عطر، طعم، بافت و مقبولیت کلی نمونه‌های پنیر با استفاده از ۱۲ نفر پانلیست نیمه ماهر و به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳۷ صورت گرفت. پنیر سفید فراپالایش داخل آب نمک در طول دوره آزمون به‌عنوان شاهد به‌کار گرفته شد.

آزمون ارزیابی مهارکنندگی رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در سطح پنیر توسط فیلم‌های کامپوزیتی

تکه‌های پنیر (۱/۷×۲۱×۲۳ میلی‌متر) تحت شرایط آسپتیک بریده شده و سطح بالایی آن‌ها با ۴۰ میکرولیتر *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC19115 تلقیح شدند تا تعداد باکتری اولیه حدود ۵/۳ log cfu/g به‌دست آید. سپس فیلم‌های کامپوزیتی بر سطح پنیر تلقیح شده قرار گرفته و در دمای ۴ درجه سلسیوس ذخیره شدند. نمونه پنیر تلقیح شده بدون فیلم به‌عنوان شاهد استفاده شد. در فواصل روزهای صفر، ۳، ۸، ۱۱، ۱۴ بعد از برداشتن فیلم‌ها نمونه‌های پنیر در کیسه‌های هضم حاوی آب پپتون استریل ۰/۱ درصد برای ۱/۵ دقیقه هضم شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند (Divsalar *et al*., 2018).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. داده‌ها ابتدا توسط آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و سپس از آزمون چند دامنه دانکن برای نشان دادن تفاوت معنی‌داری ($p<0/05$) بین نمونه‌ها استفاده شد.

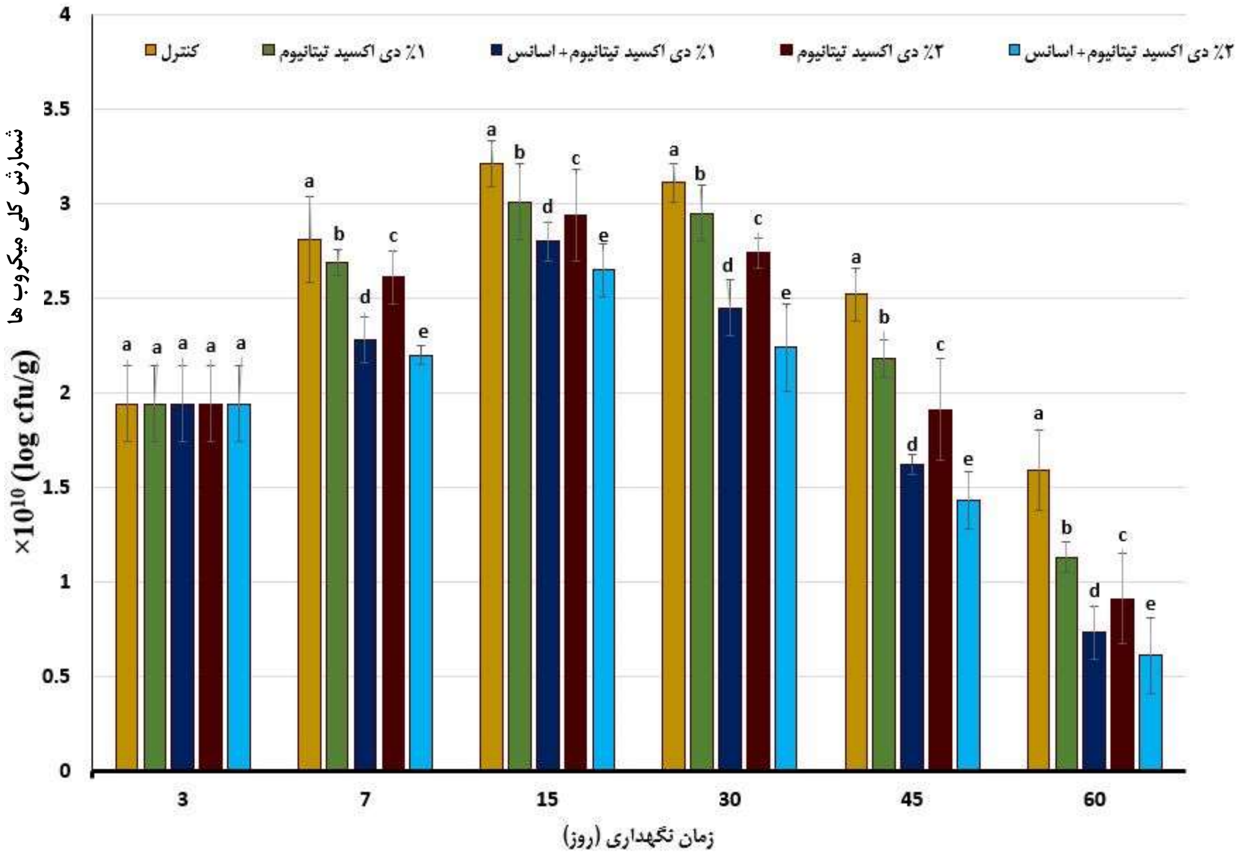
نتایج و بحث

شمارش کلی باکتری‌ها

شکل ۱ شمارش کلی باکتری‌ها را در طی ۶۰ روز ذخیره‌سازی پنیر نشان می‌دهد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس نوع تیمار و زمان تاثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر شمارش کلی میکروبی داشت. شمارش کلی با گذر زمان در تمامی تیمارها تا روز ۱۵ افزایش و سپس کاهش یافت. در واقع این افزایش ابتدایی و سپس کاهش می‌تواند مربوط به رهایش

نفوذ ترکیبات ضدمیکروبی از پوشش به داخل نمونه پنیر باشد که نیازمند زمان هست (Mushtaq *et al*., 2018). در کل نتایج شمارش کلی در بین تیمارها بترتیب: نمونه کنترل> ۱٪ وزنی TiO_2 > ۲٪ وزنی TiO_2> ۱٪ وزنی TiO_2+ اسانس> ۲٪ TiO_2+ اسانس بود. بیشترین شمارش کلی مربوط به تیمار کنترل و کمترین آن مربوط به تیمار حاوی ۲٪ وزنی TiO_2 با اسانس بود. افزایش سطح دی‌اکسید تیتانیوم در پوشش موجب کاهش شمارش کلی گردید. این مشاهدات مطابق با نتایج به‌دست آمده توسط Youssef و همکاران (۲۰۱۵) بود که نشان دادند تعداد باکتری‌های پنیر سفید نرم به‌طور قابل توجهی با پوشش‌دهی توسط محلول کامپوزیتی کیتوزان/ پلی‌وینیل الکل حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کاهش یافته بود. این محققین عنوان نمودند که اثرات ضدباکتریایی این پوشش کامپوزیتی مربوط به نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بوده است.

نتایج همچنین نشان داد که افزودن اسانس به پوشش نانو کامپوزیتی نیز موجب کاهش شمارش کلی باکتری‌ها گردید. همراستا با این نتایج، روشنی و همکاران (۱۳۹۴) نیز گزارش نمودند که استفاده از اسانس آویشن در پنیر موزارلا موجب کاهش شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه پنیر گردید. در واقع اثرات ضدباکتریایی اسانس آویشن مربوط به ترکیبات فعال موجود در آن می‌باشد که مهم ترین این ترکیبات ضدباکتریایی عبارتند از تیمول و کارواکرول. این ترکیبات از طریق تجزیه دیواره سلولی، آسیب زدن به غشای سیتوپلاسمی، آسیب زدن به غشا پروتئینی و در نتیجه نشت محتوی سلول به بیرون و انعقاد سیتوپلاسم موجب تخریب باکتری‌ها می‌شوند (Ziaee *et al*., 2018). نکته قابل توجه اثر سینرژیستیکی است که اسانس و دی اکسید تیتانیوم نشان دادند. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود افزودن اسانس به پوشش حاوی ۱ درصد دی‌اکسید تیتانیوم تاثیر بازدارندگی بیشتری نسبت به پوشش حاوی ۲ درصد دی‌اکسید تیتانیوم داشته است. بنابراین می‌توان با افزودن اسانس میزان نانوذرات را در پوشش کاهش داد. در یک تحقیق مشابه Li و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثر روغن اسانسی میخک بر خصوصیات فیلم‌های کیتوزان/ نشاسته حاوی نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید پرداخته و عنوان نمودند که این دو ترکیب دارای اثرات ضدمیکروبی سینرژیستکی بوده‌اند.



شکل ۱- شمارش کلی میکروبی نمونه‌های مختلف پنیر پوشش داده شده در طول دوره نگهداری.

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$).

شمارش کپک و مخمر

عمده مشکل میکروبی پنیر فراپالایشی، رشد کپک و مخمر در سطح پنیر و تولید لکه‌های رنگی می‌باشد که در صورت مهار رشد کپک و مخمر می‌توان ماندگاری پنیر را به بیش از دو ماه افزایش داد (Nottagh *et al.*, 2018) جدول ۱ جمعیت کپک و مخمر را در طی دو ماه ذخیره‌سازی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، نوع تیمارها و زمان هر دو تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بر جمعیت کپک و مخمر داشتند. در تیمارهای پوششی حاوی اسانس آویشن شیرازی در طول دوره نگهداری آلودگی با کپک و مخمر مشاهده نشد. این مشاهدات می‌تواند به دلیل اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی باشد. همراستا با این نتایج روشنی و همکاران (۱۳۹۴) به بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس آویشن بر پنیر موزارلای نگهداری شده در دمای یخچال پرداخته و گزارش نمودند که در نمونه‌های حاوی اسانس آویشن، رشد کپک‌ها به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد. با این حال، اولین آلودگی با مخمر در تیمار کنترل و در روز ۱۵ نگهداری مشاهده شد و با گذر زمان افزایش یافت. در تیمارهای پوششی حاوی TiO_2 در روز ۳۰ام مخمرها مشاهده شدند و روند افزایشی تا آخر دوره نگهداری داشت. نتایج مشابهی قبلا توسط Pluta-Kubica و همکاران (۲۰۱۹) بر روی پوشش‌دهی پنیر نرم با فیلم خوراکی ترکیبی پروتئین آب‌پنیر/ فورچلارن همراه با عصاره یربامیت و چای گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که پوشش دادن پنیر راس با کیتوزان/ پلی‌وینیل الکل حاوی نانوذرات TiO_2 باعث کاهش رشد کپک در سطح پنیر می‌شود (Youssef و همکاران، ۲۰۱۹). نانوذرات TiO_2 با تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا دارای عملکرد ضدمیکروبی هستند (Youssef *et al.*, 2015). در هیچ‌کدام از تیمارهای پوششی کپک و مخمر در سطح پنیر مشاهده نگردید و همه تیمارهای پوششی در آخر دوره نگهداری از ظاهر قابل قبولی برخوردار بودند (شکل ۲).

جدول ۱- شمارش کپک و مخمر نمونه های پوشش داده شده در طول دوره نگهداری ۶۰ روزه ($×۱۰^۲$cfu/g)

تیمار	۳	۷	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
کنترل	۰^{aA}	۰^{aA}	۱/۱۲ ± ۰/۱۳^{bB}	۲/۵± ۱/۱^{cC}	۴/۳± ۱/۲^{cD}	۵/۱± ۰/۴^{cE}
٪۱TiO_2	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰/۹± ۰/۲^{bB}	۱/۴۵± ۰/۱۵^{bC}	۲/۲± ۰/۳^{bD}
اسانس+ ٪۱TiO_2	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}
٪۲TiO_2	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰/۷۶± ۰/۳۱^{bB}	۱/۵± ۰/۳۵^{bC}	۲/۰± ۰/۴^{bD}
اسانس+ ٪۲TiO_2	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}	۰^{aA}

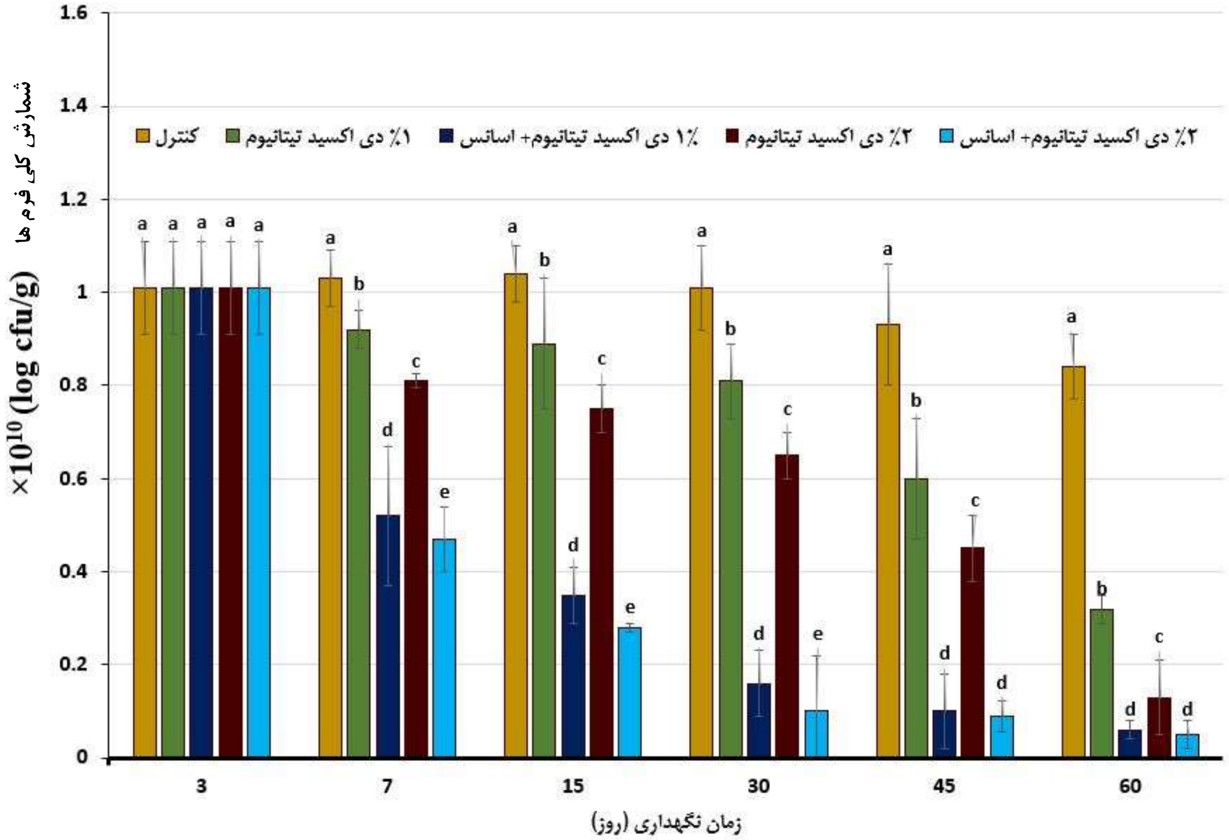
میانگین‌های دارای حروف مشترک کوچک در هر ستون و میانگین‌های دارای حروف مشترک بزرگ در هر ردیف در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۲- ظاهر پنیرهای پوشش داده نشده (A)، پوشش داده شده با محلول کامپوزیتی: کنترل (B)، حاوی ۱٪ وزنی TiO_2 (C)، ۱٪ وزنی TiO_2 با اسانس (D)، ۲٪ وزنی TiO_2 (E) و ۲٪ وزنی TiO_2 با اسانس (F) در آخر دوره ۶۰ روزه نگهداری در دمای یخچال (٤ درجه سلسیوس).

جمعیت کلی‌فرم

تاثیر پوشش‌دهی پنیرهای فراپالایش بر تعداد کلی‌فرم در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود نوع تیمار پوششی و زمان، تاثیر معنی‌داری در جمعیت کلی‌فرم پنیرهای پوشش داده شده داشت. در تیمار کنترل پس از پوشش‌دهی جمعیت کلی‌فرم تا روز ۱۵ اندکی افزایش سپس روند کاهشی در پیش گرفت. در تیمارهای پوششی حاوی نانوذرات TiO_2 در سطح ۱٪ و ۲٪ وزنی به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) پس از پوشش‌دهی جمعیت کلونی کلی‌فرم به‌تدریج کاهش یافت. بین تیمارهای پوششی (حاوی ۱ و ۲٪ نانوذرات) نیز در کل دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بدین‌صورت که تیمار پوششی حاوی ۲٪ نانوذرات به طور موثرتری تعداد کلی‌فرم را کاهش داد. Del Nobile و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که پوشش کیتوزان به‌عنوان حامل ترکیبات ضدمیکروبی باعث کاهش جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم در پنیر فیوردی‌لاتته می‌شود ولی به تنهایی و بدون افزودن ترکیبات ضدمیکروبی نمی‌تواند به‌طور موثر تعداد کلی‌فرم را کاهش دهد. از سوی دیگر، Zantar و همکاران (۲۰۱۴) بیان داشتند که افزودن اسانس آویشن باغی و پونه کوهی در فرمولاسیون پنیر در کاهش جمعیت کلی‌فرم پنیر موثر بوده و منجر به افزایش مدت ماندگاری پنیر تازه حاصل از شیر بز گردید. در پژوهش دیگری گزارش شده است که اسانس‌های طبیعی در پنیر فیوردی‌لاتته جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم را به طور محسوسی کاهش می‌دهند (Gammariello *et al.*, 2008).



شکل ۳- جمعیت کلی‌فرمی پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

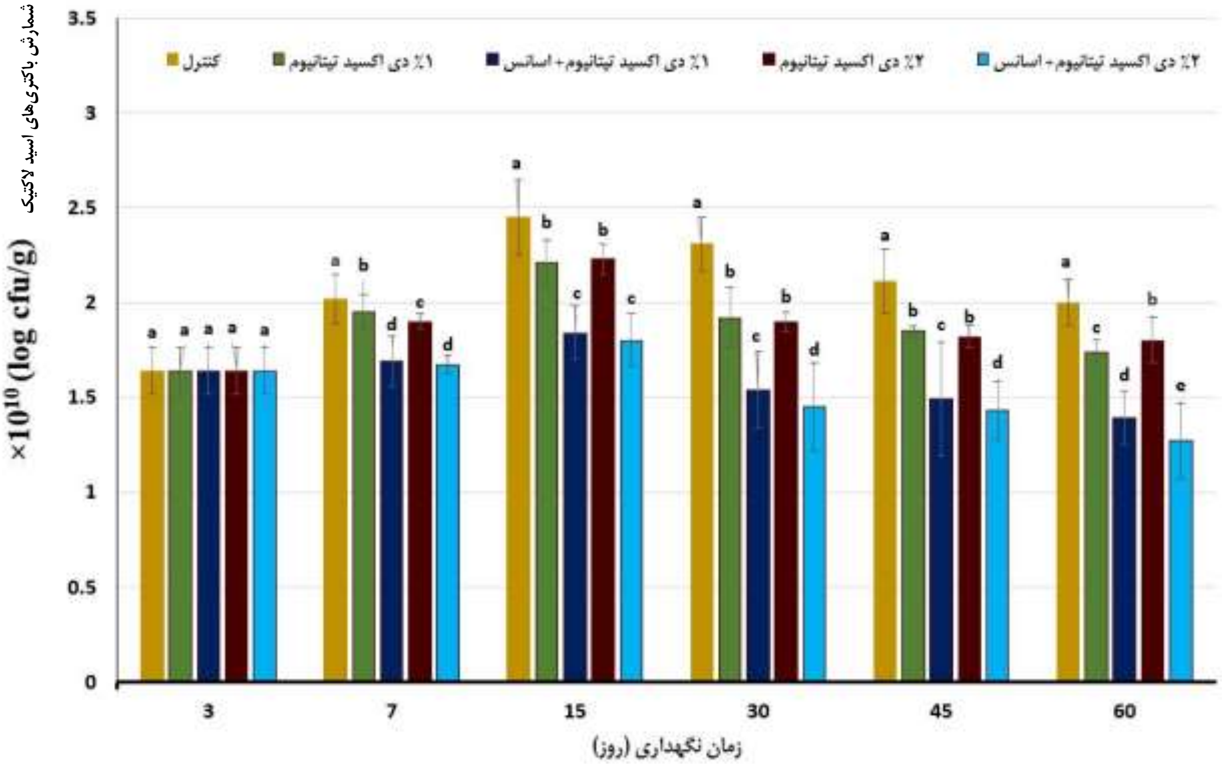
جمعیت اسید لاکتیک باکتری‌ها (استارترها)

شکل ۴ نتایج تاثیر پوشش‌های خوراکی مختلف را برروی جمعیت استارتر را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تاثیر تیمار و زمان بر جمعیت استارتر معنی‌دار بوده است. تا روز ۱۵ نگهداری جمعیت استارتر روند افزایشی و سپس تا آخر دوره نگهداری روند کاهشی داشت. در کل دوره نگهداری جمعیت اسید لاکتیک باکتری‌ها به‌ترتیب زیر بود: نمونه کنترل> ۱٪ TiO_2> ۱٪ TiO_2 با اسانس> ۲٪ TiO_2> تیمار حاوی ۲٪ TiO_2 و اسانس.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد افزودن نانوذرات TiO_2 و اسانس آویشن شیرازی اثر باز دارندگی بر روی میکروفلور استارتر پنیر دارد. این بدان معنی است که اثر بازدارندگی اسانس‌ها در مقایسه با نانوذرات TiO_2 به مقدار قابل توجهی بیشتر است. Mushtaq و

همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند افزودن عصاره پوست انار در فیلم زئین تفاوت معنی‌داری در جمعیت استارتر پنیرهای هیمالیایی پوشش داده شده ایجاد کرد.

یکی از عوامل موثر در رسیدن پنیر، باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که باعث ایجاد بافت، طعم و کیفیت مناسب در پنیر می‌شوند. لذا حفظ جمعیت آن‌ها در سطح مطلوب در پنیر الزامی است و با توجه به عطر و طعم ضعیف پنیر فراپالایشی، حفظ جمعیت اسید لاکتیک باکتری‌ها با تفاوت محسوس بین تیمارهای پوششی مزیت بالقوه‌ای محسوب می‌گردد.



شکل ٤- جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$).

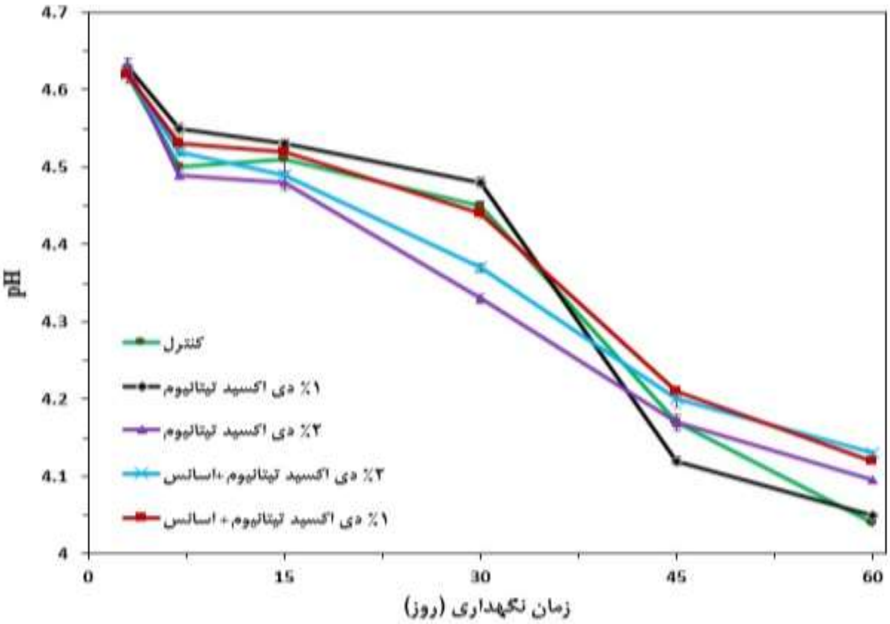
pH

شکل ۵ تاثیر پوشش‌های مختلف را بر pH پنیر در طول ۶۰ روز نگهداری نشان می‌دهد. pH تمامی نمونه‌ها با گذشت زمان ($p<0.05$) کاهش یافت. بیشترین مقدار کاهش مربوط به نمونه کنترل بود. این امر می‌تواند به دلیل خروج رطوبت بیشتر از نمونه کنترل نسبت به سایر نمونه‌ها باشد. همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین تیمارهای کنترل و تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ وزنی TiO_2 و ترکیب آن‌ها با اسانس آویشن شیرازی اختلاف معنی‌داری وجود داشت و این اختلاف نسبت به روزهای اول نگهداری به‌صورت ویژه‌ای بین تیمارها افزایش یافت. ولی در آخر دوره نگهداری بین تیمار پوششی حاوی ۱٪ نانوذرات TiO_2 و تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p<0.05$).

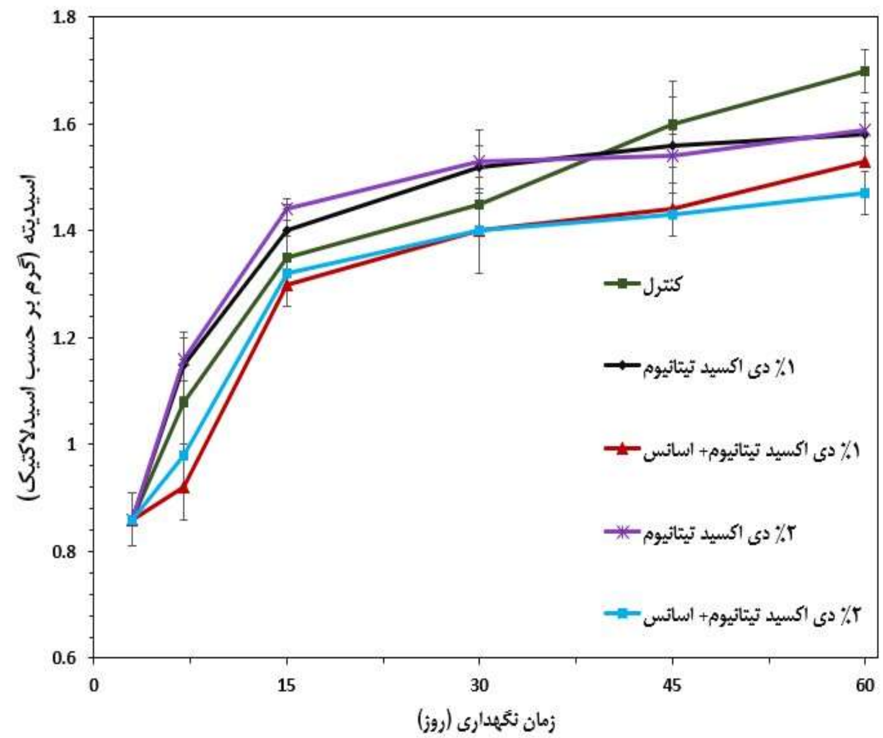
در طول فرایند تولید پنیر به دلیل فعالیت استارترها و تولید اسید به‌ویژه در روزهای نخست نگهداری در دماهای بالا جهت رسیدن محصول، شاهد افت pH خواهیم بود که این کاهش در روزهای نخست سریع‌تر بوده و در ادامه این تغییرات با شدت کمتری اتفاق می‌افتد (Nottagh *et al*., 2019). نتایج تحقیق جمشیدی و همکاران (۱۳۹۷)، Ramos و همکاران (۲۰۱۲)، Youssef و همکاران (۲۰۱۵، ۲۰۱۶) در توافق با نتایج این پژوهش است.

اسیدیته

تغییرات اسیدیته پنیرهای پوشش‌داده شده در شکل ۶ نشان داده شده است. به وضوح دیده می‌شود که اسیدیته با گذشت زمان در همه تیمارهای پوششی افزایش یافت. افزایش اسیدیته تا روز ۳۰ام با شیب بیشتری افزایش می‌یابد و با گذشت زمان نگهداری از سرعت اسید تولیدی کاسته شده است. اسیدیته در تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ TiO_2 در مقایسه با سایر تیمارهای پوششی تا یک ماه اول نگهداری به صورت معنی‌داری بیشتری بود..



شکل ۵- مقادیر pH پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.



شکل ٦- مقادیر اسیدیته پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.

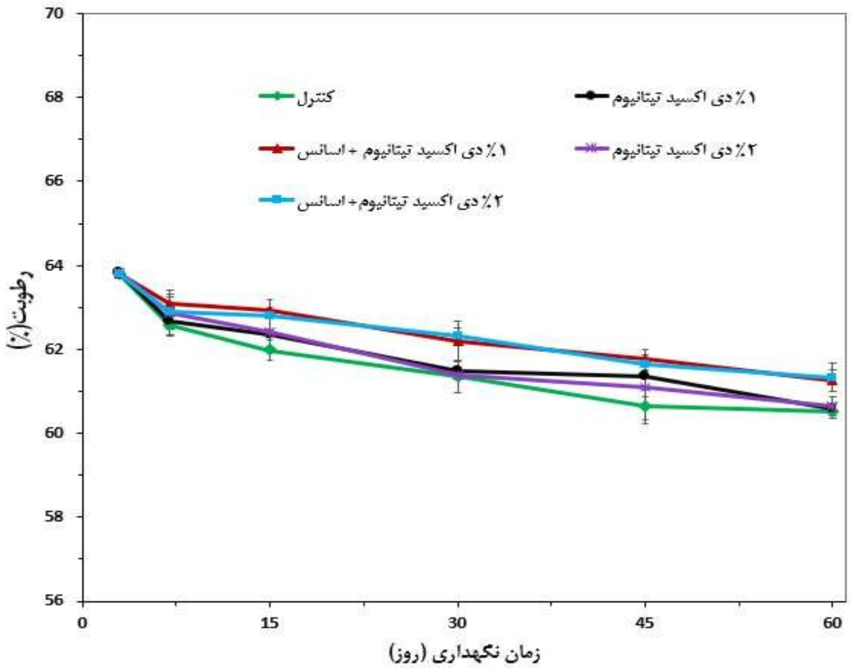
میزان اسیدیته در تیمار کنترل در تمامی دوره نگهداری افزایش معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این، از روز ۳۰ ام به بعد تفاوت قابل توجهی در اسیدیته تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ نانوذرات TiO_2 و تیمار حاوی ۲٪ نانوذرات و اسانس مشاهده نگردید.

همان‌طور که قبلا مشاهده گردید بعد از پوشش‌دهی، جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک تا روز ۱۵ نگهداری با سرعت بیشتر افزایش یافت که مطابق با روند افزایش اسیدیته بود. این امر می‌تواند به‌دلیل تولید بیشتر اسیدلاکتیک در نتیجه افزایش جمعیت باکتری‌های

تولیدکننده اسیدلاکتیک باشد (Nottagh *et al*., 2019). Diperrio و همکاران (۲۰۱۱) اسیدیته را در پنیر ریکوتا پوششی بر پایه پروتئین آب پنیر و کیتوزان اندازه‌گیری کردند و بیان کردند که افزایش اسیدیته احتمالا بخاطر تولید اسیدهای آلی است که عمدتا باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده آن هستند که جمعیت آن‌ها در طول ذخیره‌سازی افزایش می‌یابد. Yilmaz و Dagdemir در (۲۰۱۲) به نتایج مشابهی در مورد افزایش اسیدیته پنیر کاشار پس از پوشش‌دهی دست یافتند که احتمالا به دلیل انباشتگی محصولات تجزیه لاکتوز مثل اسیدلاکتیک و سایر اسیدهای فرار بود. همچنین Youssef و همکاران (۲۰۱۵، ۲۰۱۹) گزارش کردند که پس از پوشش‌دهی پنیر به‌طور قابل توجهی اسیدیته افزایش و pH کاهش یافته بود

رطوبت

نتایج حاصل از تغییرات رطوبت در طی دوره رسیدگی پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده در شکل ۷ آورده شده است. در تمامی نمونه‌ها با گذشت زمان محتوای رطوبت افت کرده است که به دلیل مهاجرت پیوسته آب به محیط اطراف است (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۷). این پدیده در ابتدای دوره نگهداری با شدت بیشتری صورت می‌گیرد. همچنین کاهش رطوبت در تیمارهای پوششی حاوی نانوذرات TiO_2 ترکیب شده در سطح ۱ و ۲٪ وزنی با اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با دیگر تیمارها به مقدار کمتری رخ داد. با گذشت زمان نگهداری بین تیمارهای حاوی اسانس و پنیرهای پوشش‌داده شده با تیمارهای حاوی نانوذرات TiO_2 و کنترل اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) وجود دارد. این امر احتمالا به خاصیت آبگریزی اسانس نسبت به سایر ترکیبات موجود در تیمارهای پوششی مربوط می‌شود. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که پوشش‌دهی پنیر در طول دوره ذخیره‌سازی باعث حفظ بهتر رطوبت می‌گردد. زیرا پوشش‌های خوراکی بر پایه کیتوزان و ایزوله پروتئین آب‌پنیر به دلیل ماهیت آب‌دوستی می‌توانند مولکول‌های آب را از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی جذب و از دست دادن آب را کاهش دهند (Nottagh *et al*., 2019). مطابق با این نتایج Youssef و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که با افزایش نانوذرات TiO_2 در پوشش‌دهی پنیر راس میزان کاهش رطوبت در پنیر به مقدار قابل توجهی کاهش یافته است. همچنین گزارش شده است که افزودن اسانس رزماری و پونه کوهی در ترکیب فرمولاسیون پوششی ناتامایسین، کاهش محتوای رطوبت پنیر کاشار را به تاخیر می‌اندازد (Yangilar, 2017). نتایج مشابهی در مطالعه قره محمدلو و همکاران (۱۳۹۶) بر تاثیر پوشش خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر حاوی نیسین روی ماندگاری پنیر سفید نمکی به‌دست آمد و بیان داشتند پوشش‌دهی باعث حفظ بهتر رطوبت در پنیر شده است.

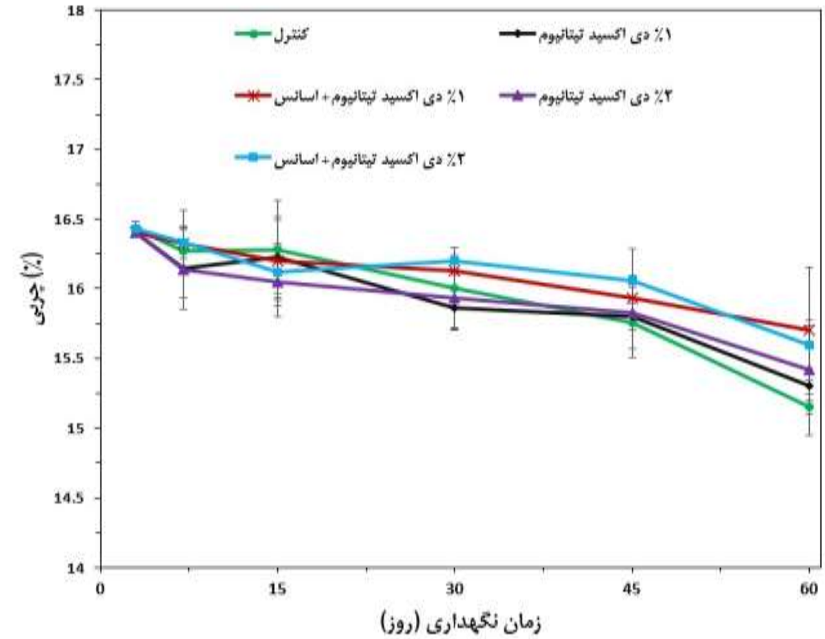


شکل ۷- محتوای رطوبتی پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.

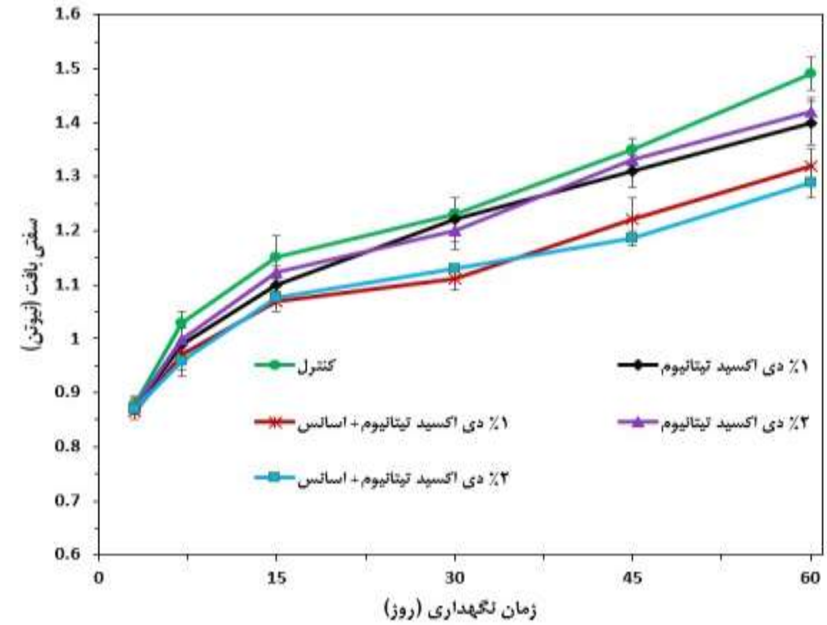
چربی

نتایج تغییرات چربی نمونه‌های پنیر در طول دوره رسیدگی در شکل ۸ نشان داده شده است. نوع تیمار و زمان هر دو تاثیر معنی‌دار ($p<0/05$) بر مقدار چربی تیمارهای پنیر داشتند. با گذشت زمان در طی دوره رسیدگی مقدار چربی در همه تیمارهای پوششی به تدریج و با شیب کمتری کاهش پیدا کرد. در پایان دوره نمونه‌برداری بین همه

تیمارهای پوشش‌دار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین کاهش چربی در تیمار کنترل و کمترین میزان کاهش چربی در تیمار حاوی ۱٪ TiO_2 ترکیب شده با اسانس آویشن شیرازی مشاهده شد.



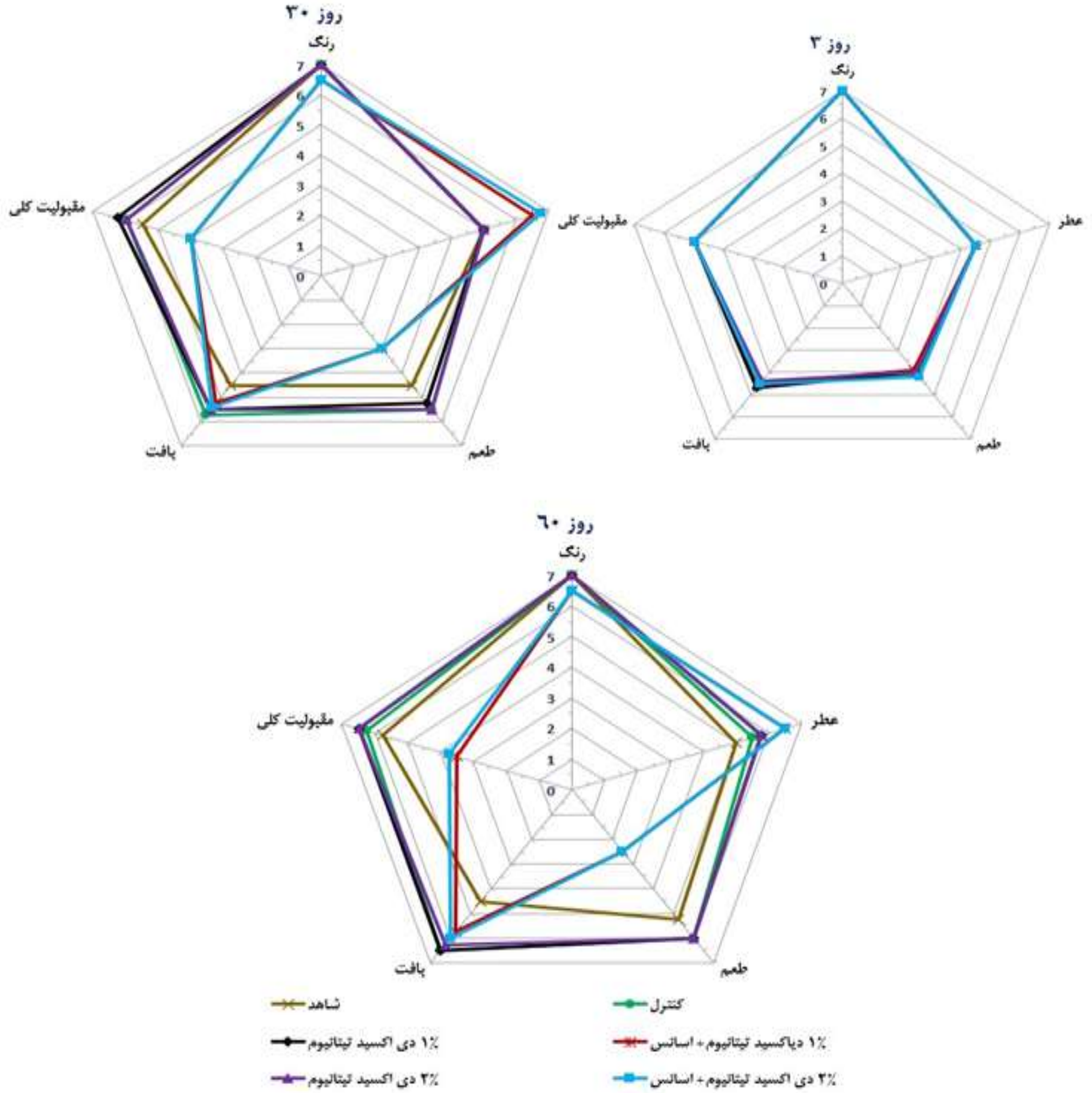
شکل ۸- محتوای رطوبتی پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.



شکل ۹- میزان سفتی بافت پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس.

با این حال بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و درصد چربی از حدود ۱۶٪ در روز سوم به ۱۴٪ در پایان دوره نگهداری رسیده بود. تیمارهای پوششی توانستند تا حد زیادی درصد چربی را در پنیر سفید فراپالایش حفظ کنند. کاهش چربی پنیرهای سفید فراپالایش می‌تواند به هیدرولیز چربی پنیر در طی دوره رسیدن پنیر به دلیل لیپازهای طبیعی پنیر و لیپازهای تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیکی و غیرلاکتیکی و سایکروتروف‌ها نسبت داده شود (Soleimani-Rambod *et al*., 2018) بنابراین تفاوت در درصد چربی می‌تواند به اختلاف در رشد باکتری‌های اسید لاکتیک و لیپولیز انجام شده در تیمارهای مختلف نسبت داده شود. کاهش درصد چربی مطابق

با نتایج قره محمدلو و همکاران (۱۳۹۶) و رمضانی و همکاران (۱۳۹۵) بود.



شکل ۱۰- ارزیابی حسی پنیرهای سفید فراپالایش پوشش داده شده با تیمارهای مختلف در روزهای ۳، ۳۰ و ٦۰ دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس؛ پنیر داخل آب نمک به عنوان شاهد استفاده شد.

ارزیابی بافت

بافت یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کیفی پنیر است. شکل ۹ تغییرات سفتی بافت نمونه‌های پنیر فراپالایش را در طول دوره رسیدگی نشان می‌دهد. نتایج حاکی از تاثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نوع تیمار و زمان بر سفتی بافت است. با گذشت زمان اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای کنترل و تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ دی‌اکسید تیتانیوم با تیمارهای حاوی اسانس مشاهده شد. تیمار کنترل بیشترین سفتی و تیمارهای حاوی اسانس به دلیل حفظ بیشتر رطوبت کمترین سفتی را داشتند. در بین تیمارهای پوششی، سفتی در طول دوره رسیدن افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل کاهش محتوای رطوبت باشد. روند تغییرات سفتی نمونه‌های پوششی حاوی اسانس مشابه و افزایشی بود. تیمارهای پوششی کنترل و تیمارهای حاوی نانوذرات TiO_2 نیز روند افزایشی مشابه داشتند. هرچند تیمار کنترل سفتی بیشتری داشت. به طورکلی، افزایش یا کاهش سفتی بافت ارتباط مستقیمی با میزان رطوبت

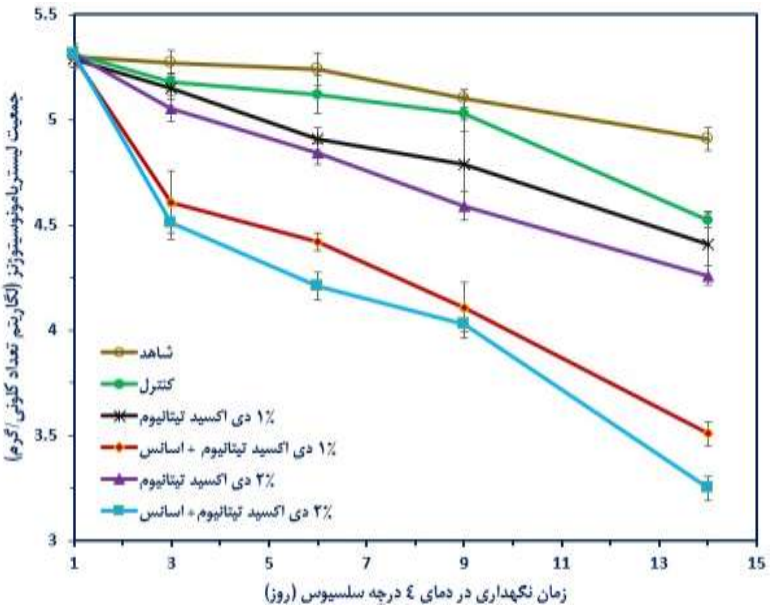
نمونه‌های پنیر پوشش‌داده شده دارد که مطابق با تحقیقات Nottagh و همکاران (۲۰۱۹)، Youssef و همکاران (۲۰۱۶، ۲۰۱۹)، Ramos و همکاران (۲۰۱۲)، Wang و همکاران (۲۰۱۹) و Berti و همکاران (۲۰۱۹) در مورد پوشش‌دهی پنیرهای مختلف با بیوپلیمرهای خوراکی بود.

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی پنیرهای فراپالایش پوشش داده شده در شکل ۱۰ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که پنیرهای پوشش داده شده رنگ و ظاهر مطلوب خود را در کل دوره ذخیره‌سازی حفظ کردند و فقط تیمارهای پوششی حاوی اسانس به دلیل رنگ جزئی زرد در شاخص رنگ دچار افت گردیدند، اما اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. تیمارهای حاوی ترکیب اسانس و نانوذرات باعث افزایش قابل توجه عطر و بو در مقایسه با سایر تیمارها شدند که به علت بوی طبیعی و مطلوب اسانس آویشن شیرازی می‌باشد. روشنی و همکاران (۱۳۹۴) نیز همراستا با این نتایج، عطر و بوی بسیار خوبی را برای پنیرهای موزارلای حاوی اسانس آویشن گزارش نمودند. ارزیابی طعم پنیرها نشان داد که پنیرهای حاوی اسانس دارای طعم تند نامطلوب بودند که خواص ارگانولپتیکی آن را به حد قابل توجهی کاهش داده بود. با گذشت زمان طعم تیمارهای حاوی نانوذرات و تیمار کنترل به‌طور قابل توجهی نسبت به پنیر داخل آب نمک و به خصوص تیمارهای حاوی ترکیب TiO_2– اسانس افزایش یافته بود. ارزیابی بافت پنیرها نشان داد که با گذشت زمان، مقبولیت بافت تمام تیمارهای پوششی نسبت به پنیر داخل آب نمک افزایش یافته است و امتیاز بالاتری را کسب کردند. با توجه به این که نرمی بافت پنیرهای سفید فراپالایش یکی از مشکلات مربوط به آن‌ها است، این ارزیابی نشان داد که تا حد زیادی از نرمی بافت کاسته شده و پذیرش آن توسط مصرف‌کننده افزایش پیدا کرده است. به‌طور کلی، می‌توان از نتایج ارزیابی حسی استنباط کرد که تیمارهای حاوی نانوذرات TiO_2 و تیمار کنترل بالاترین امتیازات ممکن را توسط ارزیاب‌ها کسب نمودند. این نتایج در توافق با یافته‌های Conte و همکاران (۲۰۰۹)، Ramos و همکاران (۲۰۱۲)، Nottagh و همکاران (۲۰۰۹)، Delnobile و همکاران (۲۰۰۹)، و قره محمدلو (۱۳۹۵) است. این محققان بیان کردند که فرایند پوشش‌دهی باعث بهبود خواص حسی (بو، طعم، بافت، رنگ و مقبولیت کلی) پنیر شده است. در کل بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی میتوان امید داشت که بتوان در عین استفاده از پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر و کیتوزان حاوی نانوذرات تیتانیوم اکسید و اسانس آویشن شیرازی در پنیر، خواص حسی محصول را در حد نرمال خود حفظ کرده و از خواص ضدمیکروبی این ترکیبات به‌طور مطلوب استفاده کرد.

مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در سطح پنیر فتای فراپالایش

اثرات مهاری فیلم‌های کامپوزیتی بر جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز*های تلقیحی در پنیر فراپالایش در شکل ۱۱ نشان داده شده است.



شکل ۱۱- ارزیابی مهار رشد پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* در سطح پنیرهای سفید فراپالایش با کاربرد فیلم‌های کامپوزیتی مختلف تا ١٤ روز در دمای ٤ درجه سلسیوس؛ پنیر بدون کاربرد فیلم در سطح به‌عنوان شاهد استفاده شد.

نتایج نشان داد که زمان و نوع فیلم کامپوزیتی هر دو تاثیر معنی‌دار ($p<0/05$) در جمعیت باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* داشتند. در همه پنیرهای تلقیحی پوشش‌داده شده و نشده، جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* تا روز ۱۴ام کاهش یافت. فیلم‌های حاوی اسانس کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد باکتری‌ها را در روز سوم نشان دادند به‌طوری که جمعیت باکتری پس از به‌کارگیری فیلم‌های کامپوزیتی حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در ترکیب با اسانس آویشن شیرازی از ۵/۳ log cfu/g به‌ترتیب به ۴/۶۱ و ۴/۴۸ log cfu/g کاهش پیدا کرد. کاهش در جمعیت باکتریایی پنیرهای که با فیلم‌های کامپوزیتی پوشش داده شده بودند با سرعت بیشتری نسبت به تیمار شاهد انجام گرفت، به نحوی که در پایان دوره آزمون جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در فیلم‌های کامپوزیتی حاوی اسانس آویشن شیرازی برابر بین ۳/۵۱– ۳/۲۵ بود. کاهش تعداد باکتری‌ها در همه تیمارها به تولیدمثل میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین نسبت داده می‌شود. این پدیده به دلیل سنتز پروتئین‌های سازگار با سرما در باکتری‌های سایکروتروف در دمای پایین اتفاق می‌افتد که بار کلی را کاهش می‌دهد (Divsalar *et al*., 2018). هم راستا با این نتایج Divsalar و همکاران (۲۰۱۸) و Lotfi و همکاران (۲۰۱۸)؛ بیان کردند که پوشش‌دهی پنیر فراپالایش باعث کاهش قابل توجهی در جمعیت باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌شود.

در کل این نتایج بیانگر این موضوع بود که بالاترین رشد لیستریا در نمونه کنترل بوده و کمترین میزان رشد لیستریا نیز در نمونه پوشش داده شده در حضور ۲ درصد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اسانس آویشن شیرازی بوده است. همچنین نتایج نشان داد که افزایش درصد تیتانیوم اکسید نیز می تواند باعث کاهش رشد لیستریا در نمونه های پنیر گردد. بنابراین می توان گفت که نانوذرات تیتانیوم اکسید و اسانس اویشن شیرازی دارای اثرات هم‌افزایی بوده و در حضور هر دوی این ماده ها، رشد لیستریا بیشتر کنترل گردیده است. به‌طور کلی، نتایج حاصل از ارزیابی قابلیت فیلم‌های کامپوزیتی در مهار رشد لیستریا مونوسیتوژنز در سطح پنیر تاییدکننده این موضوع بود که فیلم‌های کامپوزیتی به دلیل حضور کیتوزان و نانوذرات TiO2 و به خصوص اسانس آویشن شیرازی به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی می‌توانند در جهت ممانعت از شیوع و گسترش لیستریوز در سطح پنیرهای سفید فراپالایش به‌کاربرده شوند

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که فیلم‌های کامپوزیتی به دلیل خاصیت ضدمیکروبی کیتوزان و نانوذرات TiO_2 و به‌ویژه اسانس می‌توانند به‌طور قابل ملاحظه‌ای رشد *لیستریا موسیتوژنز* را در سطح پنیر سفید فراپالایش مهار کنند. تیمارهای پوششی مختلف علیرغم کاهش جمعیت استارتر نسبت به تیمار پوششی کنترل تاثیر منفی در جمعیت استارترها نداشته و باعث حفظ استارترها در پنیرهای فراپالایش شدند. افزودن ۲٪ وزنی نانوذرات TiO_2 نسبت به ۱٪ وزنی باعث کنترل بهتر کپک و مخمر در سطح پنیر نسبت به تیمار کنترل گردید، در حالیکه تیمارهای حاوی اسانس هیچ‌گونه کپک و مخمری را در طول دوره ذخیره‌سازی نشان ندادند. افزایش درصد نانوذرات TiO_2 از ۱ به ۲٪ و ترکیب کردن آن‌ها با اسانس کاهش معنی‌داری را در کلی‌فرم‌ها نسبت به تیمار کنترل ایجاد کرد. کاهش pH و افزایش اسیدیته در همه تیمارهای پوششی اتفاق افتاد که می‌تواند از این طریق موجب افزایش عمر ماندگاری و ممانعت از رشد پاتوژن‌ها در پنیرهای فتای فراپالایش شود. کاهش رطوبت و چربی در تیمارهای پوششی با افزایش زمان ماندگاری به دلیل آب‌اندازی و لیپولیز چربی‌اتفاق افتاد. پوشش دهی باعث بهبود بافت پنیر شد که با توجه به بافت بسیار نرم پنیر سفید فراپالایشی، پوشش‌دهی به‌عنوان روش آسان، ارزان و موثر می‌تواند گامی در جهت بهبود بافت باشد. بنابراین فیلم‌ها و پوشش‌های کامپوزیتی حاوی نانوذرات TiO_2 و اسانس آویشن شیرازی می‌تواند در بسته‌بندی و پوشش‌دهی پنیر فتای فراپالایش جهت افزایش کیفیت، ایمنی و افزایش عمر ماندگاری آن استفاده شود.

منابع

استاندارد ملی ایران. ۱۳۸۵. شیر و فراورده های آن–تعیین اسیدیته و-ph روش آزمون. شماره ۲۸۵۲.

استاندارد ملی ایران. ۱۳۹۳. محصولات پنبر و پنیر فراوری شده –اندازه گیری میزان چربی –روش وزن سنجی (روش آزمون مرجع). شماره ۱۷۶۰۲.

استاندارد ملی ایران. ۱۳۷۸. روش ارزیابی حسی بستنی. شماره ۴۹۳۷.

جمشیدی ف. رحیمی س. فدائی نوغانی و. (۱۳۹۷). مطالعه اثر فیلم خوراکی ژل آلوئه ورا– صمغ فارسی بر ویژگی‌های پنیر سفید ایرانی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۳ (۱):۱: ۶۳–۷۴.

رمضانی ا. جلیل زاده ع. حصاری ج. (۱۳۹۵). تاثیر پوشش خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر و ناتامایسین بر کیفیت و ماندگاری پنیر سفید ایرانی. نشریه حوزه سلامت و بهداشت مواد غذایی، ۲۳: ۱۲– ۱.

روشنی س. گوهری اردبیلی ا. آریان فر ا. (۱۳۹۴). بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس آویشن بر پنیر موزارلای نگهداری شده در دمای یخچال. نشریع پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۳: ۲۴۶-۲۳۳.

قره محمدلو ا. جلیل زاده ع. حصاری ج. (۱۳۹۵). تاثیر پوشش خوراکی بر پایه کنسانتره پروتئین آب‌پنیر حاوی نیسین روی ماندگاری پنیر سفید آب نمکی. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۴(۶۶): ۲۶۹-۲۶۱.

Artiga-Artigas, M., Acevedo-Fani, A. & Martín-Belloso, O., 2017, Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*, 76, 1-12.

Berti, S., Resa, C. P. O., Basanta, F., Gerschenson, L. N. & Jagus, R. J., 2019, Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, 31, 100447.

Cano Embuena, A. I., Cháfer Nácher, M., Chiralt Boix, A., Molina Pons, M. P., Borrás Llopis, M., Beltran Martínez, M. C. & González Martínez, C., 2017, Quality of goat′ s milk cheese as affected by coating with edible chitosan-essential oil films. *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), 68-76.

Conte, A., Gammariello, D., Di Giulio, S., Attanasio, M. & Del Nobile, M. A., 2009, Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 887-894.

Conte, A., Scrocco, C., Sinigaglia, M. & Del Nobile, M. A., 2007, Innovative active packaging systems to prolong the shelf life of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2126-2131.

Del Nobile, M. A., Gammariello, D., Conte, A. & Attanasio, M., 2009, A combination of chitosan, coating and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di latte cheese shelf life. *Carbohydrate polymers*, 78(1), 151-156.

Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L. & Porta, R., 2011, Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2324-2327.

Divsalar, E., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Lotfi, M. & Kuswandi, B., 2018, Characterization of cellulosic paper coated with chitosan-zinc oxide nanocomposite containing nisin and its application in packaging of UF cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1311-1318.

Gammariello, D., Di Giulio, S., Conte, A. & Del Nobile, M. A., 2008, Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4138-4146.

Hannon, J. A., Lopez, C., Madec, M. N. & Lortal, S., 2006, Altering renneting pH changes microstructure, cell distribution, and lysis of Lactococcus lactis AM2 in cheese made from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 812-823.

Li, W., Zheng, K., Chen, H., Feng, S., Wang, W. & Qin, C., 2019, Influence of nano titanium dioxide and clove oil on chitosan–starch film characteristics. *Polymers*, 11(9), 1418.

Lotfi, M., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Divsalar, E. & Kuswandi, B., 2018, Nanostructured chitosan/monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobial activity against Listeria monocytogenes on ultrafiltered white cheese. *LWT- Food Science and Technology*, 92, 576-583.

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Carmo Avides, M. D. & Vicente, A. A., 2010, Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against Listeria monocytogenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1884-1891.

Meira, S. M. M., Zehetmeyer, G., Scheibel, J. M., Werner, J. O. & Brandelli, A., 2016, Starch-halloysite nanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 226-234.

Mushtaq, M., Gani, A., Gani, A., Punoo, H. A. & Masoodi, F. A., 2018, Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 25-32.

Nottagh, S., Hesari, J., Peighambardoust, S. H., Rezaei-Mokarram, R. & Jafarizadeh-Malmiri, H., 2019, Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia*, 75(4), 605-611.

Nottagh, S., Hesari, J., Peighambardoust, S. H., Rezaei-Mokarram, R. & Jafarizadeh-Malmiri, H., 2018, Development of a biodegradable coating formulation based on the biological characteristics of the Iranian Ultra-filtrated cheese. *Biologia*, 73(4), 403-413.

Pluta-Kubica, A., Jamróz, E., Kawecka, A., Juszczak, L. & Krzyściak, P., 2019, Active edible furcellaran/whey protein films with yerba mate and white tea extracts: Preparation, characterization and its application to fresh soft rennet-curd cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1307-1316.

Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da-Silva, J. A. & Malcata, F. X., 2012, Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6282-6292.

Soleimani-Rambod, A., Zomorodi, S., Naghizadeh Raeisi, S., Khosrowshahi Asl, A. & Shahidi, S. A., 2018, The effect of Xanthan gum and flaxseed mucilage as edible coatings in cheddar cheese during ripening. *Coatings*, 8(2), 80.

Wang, Q., Yu, H., Tian, B., Jiang, B., Xu, J., Li, D. & Liu, C., 2019, Novel Edible Coating with Antioxidant and Antimicrobial Activities Based on Whey Protein Isolate Nanofibrils and Carvacrol and Its Application on Fresh-Cut Cheese. *Coatings*, 9(9), 583.

Yangilar, F., 2017, Effects of natamycin edible films fortified with essential oils on the safety and quality parameters of Kashar cheese. *Journal of Food Safety*, 37(2), e12306.

Yilmaz, F. & Dagdemir, E., 2012, The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2582-2589.

Yilmaz, G., Ayar, A. & Akin, N., 2005, The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering*, 69(3), 269-274.

Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., Salama, H. H., El-Sayed, H. S. & Dufresne, A., 2015, Evaluation of bionanocomposites as packaging material on properties of soft white cheese during storage period. *Carbohydrate Polymers*, 132, 274-285.

Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H. & Dufresne, A., 2016, Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/carboxymethyl cellulose/zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydrate Polymers*, 151, 9-19.

Youssef, A. M., Assem, F. M., Abdel-Aziz, M. E., Elaaser, M., Ibrahim, O. A., Mahmoud, M. & Abd El-Salam, M. H., 2019, Development of bionanocomposite materials and its use in coating of Ras cheese. *Food chemistry*, 270, 467-475.

Zantar, S., Yedri, F., Mrabet, R., Laglaoui, A., Bakkali, M. & Zerrouk, M. H., 2014, Effect of Thymus vulgaris and Origanum compactum essential oils on the shelf life of fresh goat cheese. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 76-84.

Zhong, Y., Cavender, G. & Zhao, Y., 2014, Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 1-8.

Ziaee, E., Razmjooei, M., Shad, E. & Eskandari, M. H., 2018, Antibacterial mechanisms of Zataria multiflora Boiss. essential oil against Lactobacillus curvatus. *LWT*, 87, 406-412.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 729-745

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص. ۷۴۵ -۷۲۹

The effect of chitosan-whey protein based edible coating containing bionanocomposite material and *Zataria multiflora* essential oil on UF-Feta type cheese shelf life

M. Gohargani[1], H. Lashkari[*2], A. R. Shirazinejad[3]

Received: 2020.09.15
Accepted: 2020.10.21

Introduction: In recent years, the tendency to use antimicrobial edible film and coating has increased, which has increased the quality, safety and shelf life of food. Cheese is one of the most important dairy products that has a special nutritional value in human nutrition. UF-Feta cheese, which is a type of cheese, is contaminated by microorganisms such as coliforms, spore-forming bacteria and lactose-fermenting yeasts. The causative agent of listeriosis, *Listeria monocytogenes,* is transmitted through the consumption of cheese. In this study, the effect of composite edible coating based on chitosan and whey protein containing titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles and *Zataria multiflora* essential oil on shelf life, microbial, physicochemical and sensory properties of UF-Feta type cheese was investigated. Furthermore, the inhibitory effect of films from coating solutions on the growth of *Listeria monocytogenes* was also investigated.

Materials and Methods: Chitosan, whey protein isolate (WPI) (higher than 91% protein), *Zataria multiflora* essential oil (ZEO), TiO_2 nanoparticles, and glycerol were procured from Bio Basic (Canada), Hilmar Canada, Barij-Essence Co. (Iran), Acros Co. (USA), and Merck Co. (Darmstadt, Germany), respectively. In order to prepare the coatings, a solution of WPI and chitosan was prepared separately. Whey protein suspension (3%, w/v) was made by dispersing WPI in DDW subsequently heated at 90°C for 30 min at pH value of 8.0 and then cooled rapidly. Chitosan solution (10 g/L) was made by dispersing chitosan in 2% (v/v) acetic acid solution with constant mixing for 3 h at 60°C. Based on preliminary experiments, whey protein–chitosan suspension was made using blending two polymer suspensions at constant ratio of WPI/chitosan (70:30) and mixed magnetically for 15 min at 25ºC. In the next step, TiO_2 NPs (1 and 2% w/w) were incorporated and after mixing for 15 min, glycerol (30% w/w) was incorporated to the composite suspension and again stirred for 30 min. Next, ZEO (0 and 1% v/v) was incorporated into the composites suspension and sonicated for 30 min with power of 100 W.

To produce cheese samples, milk was subjected to bactofogation, pasteurization (76°C for 15 seconds), ultrafiltration and then the retentate was homogenized at a pressure of 70 bars. By adding a starter culture (10 units /1000 L), the pH of the retentate was decreased to 6.2. Then, rennet (0.004 g/ 100 g) and salt (2 g/ 100 kg) were mixed with water and added to the cheese container. Retentate was transferred to a coagulation tunnel at 37 ° C for 30 minutes to form a coagulum. After incubation, the coating solutions were sprayed on the clot using a spray device equipped with a spray gun and packed with aluminum foil. Finally, the samples were stored at 4°C. Samples were subjected to microbiological tests (contaminating microbes and starters), physicochemical (fat, titratable acidity, pH, and moisture content, texture analysis) and sensory evaluation at different ripening periods (3 to 60 days). To evaluate the growth inhibitory of *Listeria monocytogenes* on the surface of cheese by composite films, pieces of cheese (23× 21× 1.7 mm) were first cut under aseptic conditions and their upper surface was inoculated with 40 µl of *Listeria monocytogenes* (ATCC19115) until the initial bacterial count was about 3.5 log cfu /g. The composite films placed on the surface of the inoculated cheese and stored at 4°C. Film-inoculated cheese samples were used as a control. Microbial counts were done at intervals of days 0, 3, 8, 11, 14. Data analyzed with SPSS software and means were compared with Duncan multiple range test.

Results and Discussion: The results showed that TiO_2 NPs and ZEO significantly reduced total bacterial count, lactic acid bacteria and coliforms compared to control with increasing storage period. Mold and yeast colonies also increased considerably over time in the control compared to the nanoparticle-treated samples, while the While in treatments containing ZEO did not grow at all. Physicochemical analysis exhibited that the content of moisture, fat, and pH of all cheeses decreased, acidity and texture hardness increased. Sensory evaluation of UF-Feta cheeses showed that the aroma, taste and overall acceptability of the control and nanoparticle-containing coatings improved compared to the brine-treated cheese. Nevertheless, in the coating samples containing ZEO due to the negative effect of the essential oil on the organoleptic properties of cheese, consumer acceptance was significantly reduced. On the other hand, the use of composite

1 and 3. PhD Student and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Zarindasht Branch, Islamic Azad University, Zarindasht, Iran.
(* Corresponding author; Email: hlashkari@gmail.com)

films to inhibit the growth of Listeria monocytogenes on the surface of UF-Feta cheese at 4 °C for 14 days showed that composite films, especially films containing ZEO, had a significant effect on the reduction of the Listeria monocytogenes population. As a conclusion, composite films containing TiO_2 NPs and ZEO could be applied in food packaging systems, particularly at the UF-Feta cheese packaging.

Keywords: *Zataria multiflora* essential oil, Whey protein isolate, UF-Feta Cheese, Coating, Chitosan, TiO_2 nanoparticles.